

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK
KEMIČALIJE AKTIVNE U SPRJEČAVANJU BAKTERIJSKIH
BIOFILMOVA

CHEMICALS ACTIVE IN THE PREVENTION
OF BACTERIAL BIOFILMS

SEMINARSKI RAD

Laura Skukan
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: izv. prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Zagreb, 2016.

1. UVOD

2. POVIJESNI PREGLED BAKTERIJSKIH BIOFILMOVA

3. BAKTERIJSKI BIOFILMOVI

- 3.1. Formiranje bakterijskih biofilmova
- 3.2. Ekstracelularni polisaharidni matriks
- 3.3. Uloga bakterijskih biofilmova

4. MJESTA FORMIRANJA BIOFILMOVA

- 4.1. Biofilm na medicinskim uređajima
- 4.2. Formiranje biofilmova u cijevima za prijenos vode
- 4.3. Formiranje biofilmova u prehrambenoj industriji

5. METODE i AGENSI U SUZBIJANJU BAKTERIJSKIH BIOFILMOVA

- 5.1. Kemijske agensi i metode
- 5.2. Mehaničke metode
- 5.3. Bakterijski antibiofilmski polisaharidi
- 5.4. Antibiofilmski enzimi
- 5.5. Kelatirajući agensi
- 5.6. Antimikrobni peptidi
- 5.7. Anti-adhezijska sredstva

7. SAŽETAK

8. SUMMARY

9. LITERATURA

1. UVOD

Preživljavanje u nepovoljnim životnim uvjetima daleko je veće u zajednicama, stoga su i bakterije udružene u zajednice, u kojima su se zahvaljujući svojim adaptivnim karakteristikama uspjele prilagoditi na promjenjive uvjete okoliša. Njihova glavna prilagodba je formiranje biofilмова: akumulacija organskog i anorganskog materijala koji omogućavaju pričvršćivanje za površine izrađene od različitog materijala (Ghannoum i sur., 2015.).

Bakterije mogu opstati kao dva životna oblika: „planktonski“ način života (slobodno plivajuće bakterije) ili kao sesilne (pričvršćene za različite površine kao zasebne jedinice ili formirajući biofilmove). Udruživanjem u zajednice, bakterije su razvile načine zaštite u borbi protiv imunološkog sustava domaćina, antimikrobnih lijekova ili dezinfekcijskih sredstva. Kvasci i gljivice su također mikroorganizmi koji mogu formirati biofilmove (Ghannoum i sur., 2015.).

Posljednjih godina zbog povećane svijesti o utjecaju bakterijskih biofilмова na industrijske sustave, kao i na ljudsko zdravlje porastao je interes za njihova istraživanja. Energetske gubitke, oštećenja opreme, kontaminacija hrane i infekcije ljudi koje uzrokuju biofilmovi, svijetu pričinjavaju velike ekonomske gubitke.

Usprkos velikoj štetnosti, biofilmovi imaju prednosti jer čine veliki potencijal za filtriranje komunalnih, industrijskih i otpadnih voda, te formiranju biobarijera za zaštitu tla i podzemnih voda od onečišćenja. Složenost njihove aktivnosti i ponašanja zahtijevaju multidisciplinarni pristup iz područja bazične znanosti, biokemije, medicine, matematike i kliničke mikrobiologije.

Prema izvještaju Centra za kontrolu bolesti i prevenciju iz Atlante (SAD) bakterijski biofilmovi su odgovorni za 65% - 80% svih infekcija te iz tog razloga zaokupljaju veliku pažnju mikrobiologa i čine veliki izazov medicine 21. stoljeća (Ghannoum i sur., 2015.).

2. POVIJESNI PREGLED BAKTERIJSKIH BIOFILMOVA

Biofilmovi su opisani u dalekoj prošlosti, prije nego što se znalo što su ili koliko su važni. Jedan od prvih znanstvenika koji je proučavao mikroskopski život bio je Nizozemac, Antonie van Leewenhoek. Opisao je zubni plak promatrajući ga mikroskopom koji je sam konstruirao 1684. godine. Vrlo je slikovito predstavio bakterijski biofilm nazivajući ga „kora“ (engl. „scurf“). S današnjom modernom znanošću i tehnologijom sa sigurnošću možemo reći da su biofilmovi ubikvitarna forma mikroorganizama o čijem se načinu formiranja zajednice i funkcijama puno zna, ali treba istraživati i u budućnosti (Ghannoum i sur., 2015.).

Robert Koch i njegovi suradnici istraživali su bakterije isključivo kao pojedinačne planktonske kulture. Pristup Kocha i njegovih suvremenika, istraživanjem čiste bakterijske kulture dovelo je do "zlatnog doba" mikrobiologije i otkrića patogenih uzročnika tuberkuloze, kolere i difterije. Nažalost ta istraživanja skrenula su pozornost od istraživanja bakterija i njihovog stvarnog postojanja u prirodi.

Početkom 20. stoljeća shvatilo se da je taj pristup istraživanja daleko od stvarnog „bakterijskog načina života“ i njihove interakcije u prirodi. Godine 1933. Arthur Henrici je primijetio da najveći broj bakterija u vodi nisu slobodno plivajući mikroorganizmi kao plankton, već da čine bentos.

Početkom 1940. godine, H. Heukelekian i A. Heller su izvijestili o mogućnosti bakterijskog rasta na različitim površinama formirajući bakterijsku sluz ili kolonijalan rast. Također su zaključili da takve nakupine imaju različita svojstva od onih planktonskih (Hoiby, 2014.).

U desetljećima koja su uslijedila, mikrobiolozi su opisivali brojne primjere zapanjujuće raznolikosti mikrobnih interakcija. Uočili su da je svim interakcijama zajednički neposredan kontakt sa tkivom domaćina, biljke ili životinje. Ta i slična otkrića izazvala su zabrinutost mikrobiologa o dotadašnjim saznanjima planktonskog načina bakterijskog prisustva.

70.-ih i 80.-ih godina započinje razdoblje istraživanja biofilмова. Brzo se uvidjelo da su do tada jednostavna saznanja o rastu bakterija na površinama su daleko kompleksnija (Ghannoum i sur., 2015.).

U kasnim desetljećima 20. stoljeća započinje intenzivan period istraživanja značajnosti biofilma i njegova definicija se neprestano mijenjala, jer je svako novo istraživanje proširivalo dotadašnja saznanja.

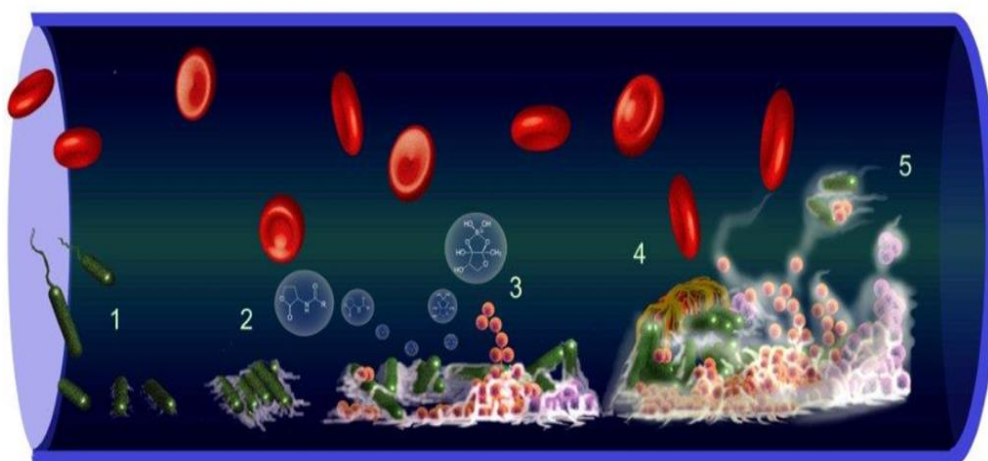
3. BAKTERIJSKI BIOFILMOVI

3.1. Formiranje bakterijskih biofilmova

Biofilm je strukturna zajednica bakterijskih stanica koje su međusobno povezane i okružene hidratiziranim polisaharidnim matriksom povezanim na živu ili neživu površinu, a bakterije ih stvaraju kao adaptaciju na nepovoljne životne uvjete. Formiranje bakterijskih biofilmova odvija se u nekoliko navedenih koraka (Slika 1) (Ghannoum i sur., 2015.):

1. i 2. Reverzibilna i ireverzibilna adsorpcija na supstrat
3. Razvoj ekstracelularnog matriksa
4. Sazrijevanje biofilma
5. Disperzija

Prvi korak je vezanje planktonskih bakterija za podlogu pomoću proteina, pila ili bičeva (Renner i Weibel, 2011.) (reverzibilna adsorpcija) nakon čega dolazi do diobe bakterijskih stanica. U reverzibilnoj fazi bakterije se Van der Waals-ovim i elektrostatskim silama, te hidrofobnim interakcijama prihvaćaju za površinu (1. i 2.). Tijekom te faze bakterije se mogu vrlo jednostavno ukloniti, npr. s pranjem. No, ako se bakterije prihvate za površinu dipolnom, vodikovom, ionskom ili kovalentnom vezom njihovo uklanjanje će biti daleko teže. Nakon određenog vremena veza između bakterija i suptrata postaje jača zbog toga što stanice proizvode velike količine (3.) ekstracelularne polisaharidne supstance (EPS). Na već postojeće biofilme mogu se adhezivno vezati nove bakterijske stanice, a na sposobnost vezanja novih stanica utječe količina hranjivih tvari u okolini. U slučaju kada se biofilmovi sastoje od više bakterijskih vrsta, matriks je tanji i stabilniji nego biofilm od jedne bakterijske vrste. Stanice se na vrhu rasprše i koloniziraju nove površine. Vezanjem novih stanica počinje sazrijevanje biofilma i povećanje količine ekstracelularnog matriksa. Sazrijevanje biofilma obuhvaća brojne procese kao što su horizontalni prijenos gena i međustanična komunikacija signalnim molekulama koje utječu na ekspresiju gena (4.). Nakon faze sazrijevanja, bakterije koje tvore biofilm mogu se odvojiti kako bi se raspršile i tvorile nove kolonije na novim lokacijama (5.). Uzrok odvajanja stanica od kolonija mogu biti jaki tok struje koji uzrokuju tekućine prisutne u okolini i nedostatak hranjivih tvari koje su potrebne za rast bakterijskih stanica (Ghannoum i sur., 2015.).



Slika 1. Shematski prikaz formiranja i razvoja biofilma
(www.fda.gov/MedicalDevices/ScienceandResearch)

3.2. Ekstracelularni polisaharidni matriks

Ekstracelularni polisaharidni matriks ima važnu ulogu u strukturi i funkciji različitih zajednica bakterija koje tvore biofilme (Kokare i sur., 2009.). Matriks u svom sastavu sadrži velike količine vode zbog kojih se javljaju jake vodikove veze koje omogućavaju čvrstu povezanost između stanica i supstrata. EPS matriks debljine je od 0.2-1.0 μm dok kod nekih vrsta ne prelazi debljinu od 10 nm. Matriks najčešće čine različite vrste makromolekula kao što su proteini, polisaharidi, glikoproteini, nukleinske kiseline i fosfolipidi (Czaczyk i Myszk, 2007.). Udio i vrsta molekula koje ulaze u sastav matriksa ovise o pojedinom soju bakterija kao i o okolini u kojoj se bakterija nalazi.

3.3. Uloga bakterijskih biofilmova

Osim što bakterijski biofilmovi imaju važnu ulogu u zaštiti bakterija od antibiotika, oni mijenjaju i ekspresiju gena onih stanica koje ulaze u bakterijski biofilm te je njihova fenotipska plastičnost jedna od adaptivnih karakteristika koja ima omogućava da se prilagode nepovoljnim uvjetima u okolišu. Kod bakterije *Pseudomonas aeruginosa* uočena je povećana ekspresija gena *algC* koji je važan za sintezu egzopolisaharida koji ulazi u sastav ekstracelularnog matriksa. Kod bakterije *Staphylococcus aureus* ustanovljeno je da je čak 48 gena inducirano kada je njezina stanica dio biofilma. Isto tako utvrđeno je da se konjugacija (prijenos plazmida) javlja u većoj količini između bakterija u biofilmu nego kod "planktonskih" bakterija (Banin i sur., 2005.). Konjugacija je horizontalan prijenos

genetičkog materijala iz stanice davatelja (donor) u stanicu primatelja (recipijent). Tim procesom prenose se geni koji najčešće donose bakteriji neke prednosti kao što su otpornost na antibiotike ili neke kemijski aktivne tvari.

4. MJESTA FORMIRANJA BIOFILMOVA

Biofilmovi se mogu formirati na različitim površinama kao što su tkiva, medicinski uređaji i cijevi kojima se prenosi voda (industrijskim ili onima kojima se voda prenosi u domaćinstva), te u prehrambenim industrijskim postrojenjima. U svim navedenim prostorima pričinjavaju velike probleme.

4.1. Biofilm na medicinskim uređajima

Na različitim medicinskim uređajima nađeni su biofilmovi koji mogu biti sastavljeni od jedne ili više vrsta bakterija (Kokare i sur., 2009.). Ove bakterije su prepoznate kao uzročnici različitih infekcija kod ljudi (infekcije dišnih puteva, srčanih zalistaka, uha, zubnih površina, rana i dr.). Najčešća mjesta formiranja biofilмова na medicinskim uređajima su kateteri, endotrahealne cijevi, proteze, kardijalni pacemakeri, stentovi, zubne površine te čak i kontaktne leće.

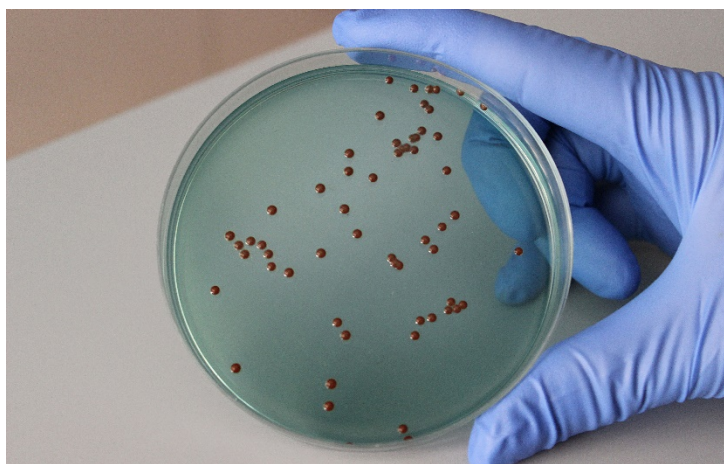
Bitno je napomenuti da je važan materijal od kojeg je izrađen supstrat, kad je riječ o prijenosu infekcije putem medicinskih uređaja. Materijali mogu biti hidrofobnog (plastika, staklo, teflon) ili hidrofilnog karaktera (neki metali, staklo) (Hadi i sur., 2010.; Neely, 2000.). Isto tako neki materijali mogu imati antimikrobni sloj koji sprječava zadržavanje bakterija na tim površinama. Bakterijski biofilmovi se najčešće formiraju na grubim i hidrofobnim materijalima, iako postoje iznimke. Problem se najčešće javlja kada se supstrat nalazi u nekom tekućem mediju (krvožilni sustav ili urinarni trakt). Tada sloj tekućine koji najčešće sadrži proteine mijenja svojstva supstrata.

Najčešći uzročnici bolničkih infekcija mogu preživjeti mjesecima na različitim površinama i tako mogu biti kontinuirani izvor zaraze, ako se ne izvodi redovita preventivna dezinfekcija (Costerton i sur., 1999.; Vraneš i Leskovar, 2009.). Većina Gram-pozitivnih bakterija, kao što su *Enterococcus* spp. (uključujući i vankomicin rezistentan *Enterococcus faecalis* - VRE), *Staphylococcus aureus* (uključujući i meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus* - MRSA) ili *Streptococcus pyogenes*, te Gram- negativne bakterije, kao što su

Acinetobacter spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P.aeruginosa*, *Serratia marcescens* ili *Shigella* spp. također mogu preživjeti mjesecima na neživim površinama.

Bakterija *Acinetobacter baumannii* (Slika 2) je jedna od vodećih uzročnika hospitalnih infekcija, posebno u jedinicama intenzivnog liječenja u svim zemljama svijeta (Goić-Barišić, 2012. i Donelli i Vuotto, 2014.). *A. baumannii* je Gram-negativna bakterija koja preživljava u bolničkim uvjetima pod pojačanim antimikrobnim tretmanima i dezinfekciji. Bakterija za zdravu populaciju nije patogena, ali kod imunokompromitiranih osoba može uzrokovati teške infekcije. Do danas su poznati i opisani brojni mehanizmi rezistencije prisutni kod ove bakterije, te je njezino širenje unutar bolničkih sredina vrlo teško kontrolirati. *A. baumannii* je multirezistentan na većinu antibiotika, uključujući kloramfenikol i aminoglikozide i stoga je infektivne bolesti uzrokovane ovim uzročnikom veoma teško liječiti (Eijkelkamp i sur., 2011.).

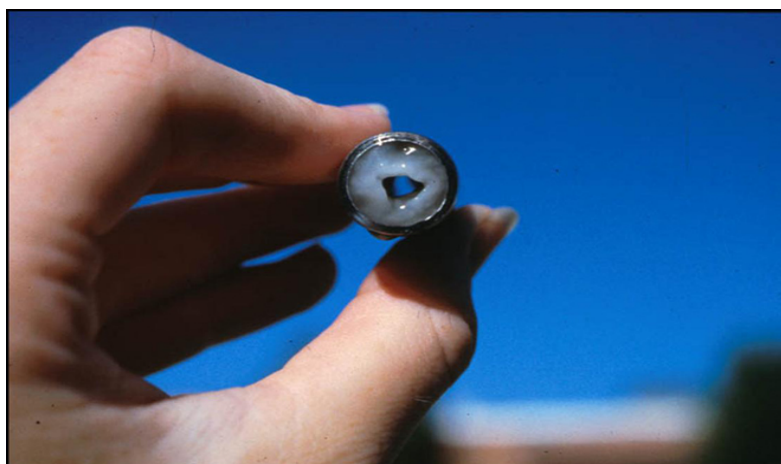
Vrlo često su kontaminirane površine koje se često dodiruju, primjerice kvake na vratima, ručke kreveta, zatim medicinska oprema kao što su termometri, stetoscopi i tlakomjeri. Hipoteza njegove sveprisutnosti u bolničkom okolišu smatra se da je posljedica formiranja biofilma. *A. baumannii* formira biofilme na abiotskim površinama od plastike i stakla jednako kao i na biotskim površinama eukariotskih stanica. Pričvršćivanje pilima i produkcija Bap površinskog proteina (engl. Biofilm Associated Protein) imaju važnu ulogu u formiranju i sazrijevanju biofilma nakon vezanja za abiotsku površinu. Pretpostavlja se da Bap protein može imati važnu ulogu i u kolonizaciji, a utvrđen je i njegov utjecaj na hidrofobnost stanice i formiranje biofilma na medicinskim površinama (Longo, 2014.).



Slika 2. Kolonije *Acinetobacter baumannii* na TTC tergitol agaru

4.2. Formiranje biofilma u cjevovodima

Površinski sustav za distribuciju pitke vode može biti pod negativnim utjecajem vanjskih izvora putem otvorenih rezervoara i oštećenja na provodnim sustavima uslijed novogradnje. Daljnje širenje biofilma ovisi o materijalu od kojih je izrađen sustav za pitku vodu, temperaturi okoline i otpornosti na dezinfekcijska sredstva (vodikov peroksid, klor i kloramini) koja se koriste za sprječavanje njihova širenja.



Slika 3. Formiranje biofilma u cjevovodu
(http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/public_version)

Ukoliko se koriste u prikladnim koncentracijama, dezinfekcijska sredstva mogu biti poprilično uspješna u uklanjanju biofilmove, no katkad bakterije uspiju razviti otpornost zbog nasumične upotrebe dezinficijensa (Kokare i sur., 2009.).

Neke od bakterija koje mogu formirati biofilmove u zemlji i vodi su: *Aeromonas* spp., *Legionella* spp., *P. aeruginosa* i *Mycobacterium avium* te mogu prodrijeti i preživjeti u sustav pitke vode, iako u malom broju. Podzemne vode, kao prirodna mineralna voda, nisu toliko izložene vanjskim utjecajima stoga dezinfekcija nije potrebna (Leclerc, 2003.).

4.3. Formiranje biofilmova u prehrambenoj industriji

Okolišni uvjeti u proizvodnim pogonima hrane, kao što su prisutnost vlage, hranjivih sastojaka i mikroorganizama u sirovini također pogoduju formiranju bakterijskih biofilmova. Takvi biofilmovi su potencijalni izvor kontaminacije hrane koja dovode do kvarenja hrane ili pak bolesti izazvanih bakterijama koje se prenose hranom. Osim toga postoji velika mogućnost da se bakterije odvajanjem s abiotičke površine vrlo lako prošire po većim površinama proizvodnog pogona.

Svojstva abiotičkih površina u proizvodnim pogonima kao i njihovo stanje, odnosno prisutnost organskih molekula, proteina iz mlijeka ili mesa ključni su faktori za formaciju biofilmova, jer utječu na početno povezivanje bakterijskih stanica. Neke od bakterija koje formiraju zajednice u proizvodnim pogonima hrane su *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* i *Listeria* spp. (Carpentier i Cerf, 2011.) .

Zbog otpornosti koja nastaje kao rezultat formiranja biofilmova, za dezinfekciju su potrebne daleko veće koncentracije (10-1000 puta veće) nego one koje inaktiviraju planktonske bakterije. Međutim, pranje vodom ili dezinfekcija površina u proizvodnji nije dovoljna kako bi se uklonili ili inaktivirali bakterijski biofilmovi.

Za uspješnu inhibiciju formiranja biofilmova prvi korak je prevencija vezanja bakterija za površine. U prehrambenoj industriji koriste se različite metode: česta sanitacija, impementacija dobre proizvođačke prakse i HACCP sustav (engl. Hazard Analysis and Critical Control Point, Analiza opasnosti na ključnim kontrolnim točkama), dezinficijensi kao što su hidrogen peroksid, kvartarni amonijevi spojevi, klor, natrij hiperklorit, peroctena kiselina i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Navedene kemikalije imaju različito djelovanje na biofilme, npr. djelotvornost klora je manja na biofilme koji su formirani od različitih vrsta bakterija (*Pseudomonas* spp. i *Listeria monocytogenes*). Upotreba tradicionalnih kemijskih dezinficijensa predstavlja i poteškoće izazivajući onečišćenje okoliša. Postoje i fizikalne metode uklanjanja biofilmova (Slika 4) koje se danas često koriste u prehrambenoj industriji; automatsko ispiranje, pranje pod tlakom, ionizirajuće zračenje i tretman ultrazvukom (Kumar i Anand, 1998.).



Slika 4. Oprema za fizikalno uklanjanje biofilma u prehrambenoj industriji
(<http://www.cleaning-with-steam.com/remove-and-kill-biofilms-in-food-plants.html>)

Bolje razumijevanje formiranja bakterijskih biofilмова, jednako kao i njihova detekcija, kontrola i uklanjanje sa površina proizvodnih pogona, potrebno je kako bi se u prehrambenoj industriji osigurala proizvodnja mikrobiološki sigurne hrane (Myszka i Czaczky, 2011.).

5. METODE I AGENSI U SUZBIJANJU BAKTERIJSKIH BIOFILMOVA

5.1. Kemijske agensi i metode:

Razne modifikacije kemijskih spojeva su glavna strategija zaštite protiv stvaranja biofilмова. Antibiotici, biocidi i ionski premazi (obloge) su najčešće supstance koje se upotrebljavaju kao zaštita (Tablica 1.). Te supstance sprječavaju prihvaćanje i širenje nezrelih biofilмова. Poznate su srebrne prevlake koje djeluju antimikrobno. Antimikrobno svojstvo u prevlakama temelji se na oligodinamskom djelovanju iona srebra koji interferiraju s diobom bakterija. *In vitro* istraživanja su potvrdila djelotvornost srebra u prevenciji infekcija, bilo u obliku prevlaka ili nanočestica raspršenih u polimernom matriksu (Rabin i sur., 2015.). Ipak, upotreba srebra u *in vivo* je ograničena zbog upitne akumulacije srebra u ljudskom tkivu.

Provedena su i istraživanja na kompozitnom materijalu sačinjenom od PVC-sa sadržajem prirodnog zeolita modificiranog srebrom. Kompozitno materijal je ispitivan kao takav ili impregniran D-tirozinom u sprječavanju formiranja biofilma kliničkog izolata bakterije *A.baumannii* (Milenkovic i sur., 2014.). Na kompozitnom materijalu je značajno smanjen broj imobiliziranih stanica na materijalu i planktonskih stanica oko materijala u

usporedbi s komercijalnim PVC-om. Svojstvo kompozita u sprječavanju formiranja biofilma, temeljilo se na repelentnoj aktivnosti D-tirozina i antibakterijskom djelovanju Ag iona u zeolitu. Istraživanje je pokazalo obećavajuću metodu za sprječavanje obraštanja edotrahealnih tubusa biofilmovima .

2015. godine znanstvenici Sveučilišta Maryland nagrađeni su za otkriće spoja koji inhibira formiranje biofilмова. Patentirani spoj inhibira proces bakterijske komunikacije (engl. quorum sensing). Susjedne bakterije unutar bakterijskog kvoruma proizvode i detektiraju kemijske signale koji se nazivaju autoinduktori. Povećanjem broja stanica unutar populacije povećava se i koncentracija autoinduktora. Kada se postigne određena koncentracija autoinduktora bakterije se počinju ponašati kao kolonije, koordiniraju ekspresiju gena i čine simbiotsko-patogeni kompleks formirajući biofilmove. Patentirani spoj bazira se na autoinduktoru AI-2 i njegovom prekursoru DPD (4,5-dihidroksi-2,3-pentandion), koji producira više od 70 vrsta bakterija. Znanstvenici su otkrili analog DPD-a koji ne izaziva bakterijsku virulenciju, ali je strukturno dovoljno sličan da bude prepoznat od DPD-a i AI-2 receptora. Vezanjem na receptore, analog DPD-a blokira vezanje AI-2 sprječavajući receptore u odašiljanju signala između bakterija i na taj način sprječavaju formiranje biofilma (Roy i sur., 2010.).

Modifikacija polimera: Antimikrobne supstance mogu se koristiti na opremi koristeći se fleksibilnim polimernim lancima. Ovi su lanci na površini uređaja povezani kovalentnim vezama i na taj način onemogućavaju povezivanje biofilмова (contact-killing surface). Istraživanje *in vitro* je potvrdilo da N-alkilpiridin bromid, kao antimikrobna supstanca vezana na poli 4-vinil N-heksil piridinu imala učinak inaktivacije $\geq 99\%$ bakterija *S. epidermidis*, *E. coli* i *P. aeruginosa* (Jansen i Kohnen, 1995.). Disperzija sile između polimernih lanaca i bakterijskih stanica sprječava vezanje bakterija na površinu i rast biofilma (Rabin i sur., 2015.).

Tablica 1.: Molekule koje sprječavaju formiranje biofilmova (*Meng i sur., 2013.; **Milenkovic i sur., 2014.).

Agensi	Mehanizam djelovanja	Efekt djelovanja
Antibiotici	ne-kovalentne i kovalentne veze	baktericidno/bakteriostatsko*
Anti-virulentni spojevi	inhibicija ekspresije gena	inhibicija formiranja <i>S. aureus</i> biofilma*
ABC-1	inhibicija c-di-GMP inducira transkripciju	inhibicija formiranja biofilma Gram pozitivnih i negativnih bakterija*
Aril rodanin	nepoznat	inhibicija formiranja <i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i> biofilmova*
Cis-2-dekanska kiselina	nepoznat	disperzija biofilmova bakterija <i>E.coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> i <i>C. Albicans</i> *
N-acetilcistein	interferira sa EPS-om kod formiranja biofilma	inhibicija formiranja <i>S. epidermidis</i> biofilmova*
Kelatori	interferira s ionima metala pri formiranju biofilma	inhibicija formiranja <i>S. aureus</i> biofilmova*
D-Tirozin	inkorporiranje u peptidoglikanski sloj stanične stijenke	inhibicija formiranja <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> i <i>A. baumannii</i> biofilmova**

5.2. Mehaničke metode:

Hidrofobnost, hrapavost površine, površinski naboj: Formiranje biofilma započinje pričvršćivanje slobodno plutajućih stanica na površini. Prve stanice se prihvaćaju na površinu vrlo slabo (reverzibilno prijanjanje). Ako se stanice odmah ne odvoje od površine one će se pilima čvršće vezati. Hidrofobnost ima važnu ulogu u formiranju bakterijskih biofilmova jer na visoko hidrofobnim površinama bakterijska adhezija i obraštanje je slabije (Feng i sur., 2015.). Hrapavost površine za razliku od glatkih pogoduje stvaranju biofilmova.

5.3. Bakterijski antibiofilmski polisaharidi:

Neki polisaharidi inhibiraju lecitin, protein koji ima primarnu zadaću vezanja bakterije za stanicu domaćina. Nalazi se na površini bakterijske stanice i omogućava vezanje za substrat prisutan na površini stanice domaćina. Kompeticija vezanja šećera za lecitin

onemogućava vezanje patogena za stanicu domaćina i formiranje biofilma (Abdel-Aziz i Aeron, 2014.).

5.4. Antibiofilmski enzimi:

N-acetil-D-glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza (GlmU) je enzim koji se veže na supstrat glukozamin-1-fosfat N-acetiltransferaza (UDP-GlcNAc) i sudjeluje u biosintezi peptidoglikana i lipopolisaharida. Inhibiranjem GlmU enzima onemogućava se stvaranje glavnih makromolekula koje ulaze u sastav ekstrapolisaharidnog matriksa koji je važan za stvaranje biofilmova. Spojevi koji djeluju kao inhibitori na taj enzim su: N-etil maleimid (NEM) i njegovi analozi te N-fenil maleimid, N,N'-(1,2-fenilen) dimaleimid (oPDM) i N-(1-frenil) maleimid (PyrM) (Rabin i sur., 2015.).

5.5. Kelatirajući agensi:

Kelatirajući agensi djeluju na stabilnost biofilmske strukture i utječu na stabilnost bakterijskih membrana. *In vitro* istraživanja su pokazala da npr. natrij citrat inhibira formiranje biofilma kod nekoliko vrsta bakterije *Staphylococcus* spp. smanjujući stabilnost membrane stanice. Međutim postoje i oni agensi koji sudjeluju u održavanju biofilmskih struktura kao što su kelatirani kationi metala; kalcij, magnezij i željezo, uključeni u održavanje cjelovitosti ekstrapolisaharidnog matriksa (Rabin i sur., 2015.).

Sigurno je da su slobodnoživuće bakterije manje rezistentne na teške metale od bakterija koje formiraju biofilme. Ekstracelularni matriks ima značajnu ulogu u zaštiti bakterija od teških metala. Smatra se da oni ulaze u interakcije s biofilmom, vežu se na komponente polisaharidnog matriksa i na taj se način smanjuje njihov negativan učinak na bakterijske stanice.

Srebro je jedno od najčešće korištenih metala u sprječavanju biofilmova. Pozitivno nabijeni ioni srebra elektrostatski privlače metal i negativno nabijenu bakterijsku membranu povećavajući antimikrobno djelovanje. Tiolne skupine iz srebra uzrokuju inaktivaciju određenih enzimatskih reakcija u bakterijama zbog čega ne dolazi do DNA replikacije i ekspresije nekih staničnih proteina (Kostakioti i sur., 2013).

5.6. Antimikrobni peptidi:

Antimikrobni peptidi koji se produciraju kao odgovor imunološkog sustava ispituju se kao novi antibiotici. Litički peptidi su druga grupa antimikrobnih peptida koji su povezani sa inhibitornim efektom na biofilmove. Oni se vežu na lipopolsaharidni dio bakterijske membrane i tako uzrokuje membransku nestabilnost (Rabin i sur., 2015.).

5.7. Anti-adhezijska sredstva:

U postupku formiranja biofilma najvažniji dio je vezanje za površinu, tako se i čitav niz istraživanja kretao u smjeru onemogućavanja vezanje bakterija za površinu. Istraživanja upotrebe pilicida nisu dali ohrabrujuće rezultate jer su *in vitro* istraživanja pokazala samo 50% inhibicije stvaranja biofilmova (Rabin i sur., 2015.).

7. SAŽETAK

U ovom radu izložen je kratki pregled o istraživanju bakterijskih biofilmova, njihovom formiranju, prijenosu, prisutnosti u raznim okolinama i kemikalijama koje služe za njihovo suzbijanje. Biofilmovi su važni s medicinskog aspekta, budući da su naše tjelesne površine od kože do zuba te crijeva pokrivene bakterijama koje potencijalno mogu izazvati bolest ili kontaminirati medicinsku opremu. Isto tako, kontaminacija površina je glavni izazov u proizvodnji hrane. S obzirom na probleme koje izazivaju, postoje različiti pristupi u istraživanju sprječavanja njihovog nastanka.

Znanstvena istraživanja zbog bakterijske multirezistentnosti na antibiotike su godinama usmjerena na pronalaženje kemijskih spojeva koji imaju baktericidno i bakteriostatsko djelovanje kao i na spojeve koji sprječavaju bakterijsko vezanje na različite površine, a time i formiranje biofilmova. Najčešće istraživani i najbolji rezultati dobiveni su s kemijskim spojevima što su srebro (taloženjem plazme), D-tirozin (repelentna aktivnost), furanon (fizikalna adsorpcija), kvarterne amonijeve soli (kovalentne veze), silika nanočestice s kvartarnim amonijevim solima (kovalentne veze), trimetilsilan (taloženje plazme s kovalentnom vezom), PLL-g-PEG (poli-L-lizin - graft - poli - etilen glikolom) i silika koloidi (superhigrofobno vezanje).

Usprkos nedostacima brojnih pristupa, pokazalo se da je biološko - kemijski pristup jedan od učinkovitijih. On istražuje svojstva anti-biofilmskog biomaterijala i kemijske spojeve koji imaju najveću ulogu u sprječavanju negativnog učinka (bolesti, smrtnost) povezanog s infekcijama uzrokovanim bakterijskim biofilmovima.

8. SUMMARY

This work presents a brief overview of historical review of the bacterial biofilm studies, their formation, transfer and presence in variety of environments and agents used for their control.

Biofilms are important from a medical point of view, since our body surface, the teeth and our intestines are covered with bacteria that can potentially cause disease or contaminate medical equipment. Also, contamination of the surface is a major challenge in food production.

There are different studying approaches of preventing their occurrence considering the problems they cause.

Due to bacterial multiple resistance to antibiotics for years, the scientific aims are focused on finding chemical compounds which have bactericidal and bacteriostatic effect so as compounds that inhibit the bacterial binding to different surfaces and, therefore, the formation of biofilms. The most common researches that obtained the best results are those with chemical compounds such as silver (plasma deposition), D-Tyrosine (repellency activity), furanones (physical adsorption), a quaternary ammonium salt (covalent bonds), silica nanoparticles with quaternary ammonium salts (covalent bonds), trimethylsilane (plasma deposition with covalently), PLL-g-PEG (poly - L-lysine - graft - poly - ethylene glycol) and the silica colloids (superhydrophobic coating).

It has been demonstrated that the biological - chemical approach is one of the most effective. Investigating the properties of anti-bacterial biomaterials and chemical compounds that have a major role in preventing the negative impact (illness, mortality) associated with infections caused by bacterial biofilms.

9. LITERATURA

- Abdel-Aziz, S.M, Aeron A. (2014.): Bacterial Biofilm: Dispersal and Inhibition Strategies. SAJ Biotechnol 1: 105. doi: 10.18875/2375-6713.1.105
- Banin E, Vasil ML, Greenberg E.P. (2005.): Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 11076–11081.
- Carpentier B., Cerf O. (2011.): Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int. J. Food Microbiol., 145, 1–8.
- Costerton, J.W., Stewart, P., Greenberg, E.P. (1999.): Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science. 21, 1318-22.
- Czaczyk, K., Mysza, K. (2007.): Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. Polish J. of Environ. 16 (6), 799-806.
- Donelli G., Vuotto C. (2014.): Biofilm-based infections in long-term care facilities. Future Microbiol. 9, 175-188.
- Eijkelkamp B.A., Stroher U.H., Hassan K.A., Papadimitriou M.S., Paulsen I.T., Brown M.H. (2011.): Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. FEMS. Microbiol.Lett. 323, 44-51.
- Feng, G., Cheng, Y, Wang, S., Borca-Tasciuc, D.A., Worobo, R.W., Moraru, C (2015.): Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough?. npj Biofilms and Microbiomes, 15022
- Ghannoum, M., Parsek, M, Whitely, M., Mukherjee, P.K. ASM (2015.): Microbial Biofilms. Press, Washington, DC, USA.
- Goić-Barišić, I. (2012.): Multiplorezistentni *Acinetobacter baumannii* (MRAB) - deset godina nakon pojave prvih izolata u Hrvatskoj. Pregledni članak, Klinički zavod za mikrobiologiju KBC Split
- Hadi, R., Vickery, K., Kumara, A.K., Charlton, T. (2010.): Biofilm removal by medical device cleaners: comparison of two bioreactor detection assays. The J.of hosp.inf., 74 (2), 160-7.
- Høiby, N. (2014.): A personal history of research on microbial biofilms and biofilm Infections. Pathol. Dis., 70 (3), 205-11.
- Jansen B, Kohnen, W. (1995.): Prevention of biofilm formation by polymer modification. J. Ind. Microbiol., vol. 15: 391-6.
- Kokare, C.R, Chacabarty, S., Khopade, A.N., Mhadik, K.R. (2009.): Biofilm: Importance and application. Indian J. of Biotechnol. 8, 158-168.

Kumar, C.G., Anand S.K. (1998.): Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. of Food Microbiol.* 42, 9-27.

Leclec, H. (2003.): Relationships between common water bacteria and pathogens in drinking-water. World Health Organization (WHO). Published by IWA Publishing, London, UK. ISBN: 1 84339 025 6.

Longo, F., Vuotto, C., Donelli, G. (2014.): Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiologica*, 37, 119-127.

Meng, C., Qingsong, Y., Hongmin, S. (2013.): Novel Strategies for the Prevention and Treatment of Biofilm Related Infections. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 18488-18501.

Milenkovic, J., Hrenovic, J., Goic-Barisic, I., Tomic, M., Jasna Djonlagic, J., Rajic, N. (2014.) Synergistic anti-biofouling effect of Ag-exchanged zeolite and D-Tyrosine on PVC composite against the clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Biofouling*, 30, No. 8, 965–973.

Neely A. N. (2000.): A survey of Gram-negative bacteria survival on hospital fabrics and plastics. *J. Burn. Care Rehabil.* 21, 523-527.

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E. (2015.): Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Medicinal Chemistry*. vol. 7 (5), 647-671.

Renner, L.D, Weibel, D.B. (2011.): Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull.* 36 (5): 347–355.

Roy, V., Smith, J. A. I., Wang, J., Stewart, J. E., Bentley, W. E., Sintim, H. O. (2010.): Synthetic Analogs Tailor Native AI-2 Signaling Across Bacterial Species. *J. Am. Chem. Soc.* 132 (32), 11141–11150.

Vraneš, J. i Leskovar, V. (2009): Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Med. Glas*, 6 (2), 147-164.